

ふりがな はらだ まさひろ  
氏名 原田 政広  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第134号  
学位授与の日付 平成20年3月24日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名

Cell dynamics in the pulpal healing process following cavity preparation in rat molars

(ラット臼歯窩洞形成後の歯髄修復過程における細胞のダイナミクス)

論文審査委員 主査 教授 大島 勇人  
副査 教授 興地 隆史  
教授 福島 正義

博士論文の要旨

【目的】

う蝕、咬耗、摩耗や窩洞形成などの歯の損傷後に、象牙質・歯髄複合体は修復能をもっている。窩洞形成は象牙芽細胞の損傷と炎症反応を惹起するが、象牙芽細胞が死滅した場合には歯髄間葉細胞が象牙芽細胞に分化すると考えられている。この現象は、歯髄内に前駆細胞もしくは組織幹細胞が存在することを示しており、実際、ヒトの永久歯や乳歯に組織幹細胞が存在することが報告されている。しかしながら、歯髄内に前駆細胞が存在するのか、組織幹細胞が存在するのか、双方が存在するのか、存在するとしたら歯髄の何処に存在するのかについては明らかになっていない。

ストレスタンパク質 heat-shock protein (HSP)-25 は多機能タンパク質であり、シャペロン機能、アポトーシスの抑制、アクチンフィラメントとの関与などが知られているが、発生と分化過程への関与も報告されている。歯の発生過程においては、細胞増殖が終わると歯髄間葉細胞が一過性に HSP-25 を発現し、その後象牙芽細胞が持続的に HSP-25 を発現することが知られており、窩洞形成、歯の再植・移植などの歯の損傷後の歯髄修復過程では再生象牙芽細胞が HSP-25 を発現することが明らかになっている。これらの結果は HSP-25 が象牙芽細胞の優れた分化マーカーであることを示している。しかしながら、窩洞形成後の細胞増殖と細胞分化との相関については十分に明らかになっていないのが現状である。今回我々は、窩洞形成後の歯髄創傷治癒過程における細胞増殖と細胞分化 (HSP-25 発現) との相関を免疫細胞化学的に検索した。

【方法】

100 日齢 Wistar 系ラットの左側上顎第一臼歯近心面に象牙質の厚み半分に達する窩洞を形成した。固定 2 時間前にプロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与し、窩洞形成直後、6、12、24 時間、2、3、5、7、10 日後にアルデヒド系固定液で灌流固定した。EDTA 脱灰後、凍結・パラフィン切片を作製し、抗 HSP-25

ポリクローナル抗体、抗 BrdU モノクローナル抗体を用いた免疫染色標本を作製し、一部試料は樹脂包埋し透過電子顕微鏡（以下電顕）にて観察した。また、右側上顎第一臼歯を対照群とした。

#### 【結果】

対照群歯髄では、象牙芽細胞が HSP-25 強陽性を示したが、歯髄内には BrdU 免疫陽性細胞はほとんど観察されなかった。窩洞形成直後には損傷部位の HSP-25 免疫陽性象牙芽細胞は層構造を失い 24 時間後には歯髄・象牙質界面から消失した。2 日になると歯髄内の細胞増殖活性が急激に増加したが、HSP-25 陽性象牙芽細胞様細胞が既に歯髄・象牙質界面に再配列していた。引き続き 5 日後まで、損傷を受けた近心歯冠部歯髄全域にわたり BrdU 陽性細胞が多数観察された。7～10 日後には損傷を受けた部位に多量の修復象牙質形成が観察されたが、歯髄内細胞増殖活性は減少した。

#### 【考察】

本研究は、ラット臼歯窩洞形成の歯髄修復過程における細胞のダイナミクスを明らかにした。本研究の結果は我々の従来の結果を確認したが、HSP-25 免疫染色標本の樹脂包埋切片の光顕および電顕観察により新たな知見を得ることができた。第一に、対照群において、象牙芽細胞に加え象牙芽細胞下層の間葉細胞が HSP-25 陽性を示し、細胞学的特徴が象牙芽細胞に類似していた。象牙芽細胞にはアポトーシスが起きていることから、成熟した歯髄においても、象牙芽細胞分化が起こり細胞の入れ替えが起きている可能性を示唆している。第二に、象牙芽細胞の損傷程度と HSP-25 発現との間に相関が見られ、HSP-25 が細胞の生死を区別するマーカーになることが示された。第三に、窩洞形成 1 日後に細胞の分化と遊走が起こり、2 日後に象牙芽細胞分化がほとんど完了し、3 日後には象牙質基質形成が開始することが明らかになった。

窩洞形成後の歯髄修復過程における細胞のダイナミクスは、細胞分裂、細胞遊走、細胞接着、細胞分化のステップを踏むと考えられている。しかし、本研究においては、術後 1 日に細胞の分化と遊走が起こり、細胞増殖活性が増加する術後 2 日には象牙芽細胞分化がほぼ終了していることが明らかになった。その後、近心歯髄全域にわたる細胞増殖活性の亢進は術後 5 日まで続いた。従って、窩洞形成後の再生象牙芽細胞が歯髄・象牙質界面に配列した後に、損傷を受けた歯髄の広範囲にわたり細胞増殖が更新する事実より、歯髄内には細胞増殖前に象牙芽細胞に分化する前駆細胞が存在し、再生象牙芽細胞分化後に歯髄の組織改変が進行することが明かとなった。歯髄広範にわたる細胞増殖活性の亢進は神経や血管のダイナミックな変化やペプチド作動性神経の増加とも対応している。術後 2～5 日の増殖細胞の運命については、術後 2 日に新たに分化した象牙芽細胞の HSP-25 発現に強弱があることから、増殖細胞の一部が象牙芽細胞に分化することは否定できない。本研究の結果は、歯髄には細胞増殖をせずに象牙芽細胞に分化する前駆細胞と歯髄広範の修復に働く組織幹細胞が配置している可能性を示すものとなった。

## 審査結果の要旨

ストレスタンパク質 heat-shock protein (HSP)-25 は多機能タンパク質であり、シャペロン機能、アポトーシスの抑制、アクチンフィラメントとの関与などが知られているが、発生と分化過程への関与も報告されている。歯の発生過程においては、細胞増殖が終わると歯髄間葉細胞が一過性に HSP-25 を発現し、その後象牙芽細胞が持続的に HSP-25 を発現することが知られており、窩洞形成、歯の再植・移植などの歯の損傷後の歯髄修復過程では再生象牙芽細胞が HSP-25 を発現することが明らかになっている。本研究は窩洞形成後の歯髄創傷治癒過程における細胞増殖と細胞分化（HSP-25 発現）との相関を免疫細胞化学的に検索し、歯の損傷後の歯髄修復過程における細胞のダイナミクスが明瞭に示されている。

本研究では、免疫電顕の手法を用い、窩洞形成後に歯髄・象牙質界面に起こる細胞レベルの変化を詳細に観察し、象牙芽細胞の遊走と分化が術後 1 日に開始し、2 日後には新たな象牙芽細胞分化が完了することが明らかになった。また、HSP-25 免疫反応が象牙芽細胞の変性と再生のマーカーとして有用であることが示されている。

本研究の特筆すべき点は、従来考えられている歯の損傷後の歯髄修復過程における細胞のダイナミクスに新しい解釈を加えている点である。窩洞形成後の歯髄修復過程における細胞のダイナミクスは、細胞分裂、細胞遊走、細胞接着、細胞分化のステップを踏むと考えられている。しかし、本研究においては、術後 1 日に細胞の分化と遊走が起こり、細胞増殖活性が増加する術後 2 日には象牙芽細胞分化がほぼ終了していることが明らかになった。その後、近心歯髄全域にわたる細胞増殖活性の亢進が術後 5 日まで続いた。従って、窩洞形成後の再生象牙芽細胞が歯髄・象牙質界面に配列した後に、損傷を受けた歯髄の広範囲にわたり細胞増殖が更新する事実より、歯髄内には細胞増殖前に象牙芽細胞に分化する前駆細胞が存在し、再生象牙芽細胞分化後に歯髄の組織改変が進行することが明かとなった。

しかしながら、現在、歯髄内のどこに前駆細胞と組織幹細胞が存在するのかについては分かっていない。本研究結果をベースに、窩洞形成後の前駆細胞と組織幹細胞の反応を解析することで、窩洞形成後の歯髄修復過程における細胞のダイナミクスの全容が解明されるであろう。更なる、研究の発展が期待される。

以上より、本研究は、卓越した形態学的な手法を用いて窩洞形成後の歯髄創傷治癒過程における細胞増殖と分化との関係を免疫細胞化学的に解明しており、歯の損傷後の歯髄修復過程における細胞のダイナミクスを明らかにしており、学位論文としての価値を認める。